

**Zur Analytik der
Inositphosphatide des Rinderhirns**

Josef Hölzl

Zur Analytik der Inositphosphatide des Rinderhirns

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Josef Hölzl
aus
Tüntenhausen bei Freising

Juni 1959



5349/60

1. Berichterstatter: Professor Dr. L. Hörhammer

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: **29. Juli 1959**

Über die Inositphosphatide des Rinderhirns und der Sojabohne

Vorläufige Mitteilung

Von

LUDWIG HÖRHAMMER, HILDEBERT WAGNER und JOSEF HÖLZL

Aus dem Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München

(Eingegangen am 20. August 1958)

Inositphosphatide kommen im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet vor. Isoliert wurden bisher ein Monophosphoinositid (MPI) aus Herzmuskel [3], Leber [10, 13], Weizenkeimen [2] und „Sojalecithin“ [15], ein Diphosphoinositid (DPI) aus Rinderhirn [6], ein Phosphatidyl-inositolphosphoryläthanolamin-di- oder -trisaccharid aus Erdnuß-Samen [12] und ein Phosphatidyl-inositol-dimannosid aus Tuberkel-Bakterien [18]. In den letzten Jahren waren besonders die Inositfraktionen des Gehirns und der Sojabohne wieder Gegenstand neuer Untersuchungen [7, 8, 9, 14, 16]. Wesentliche Ergebnisse konnten nicht erzielt werden.

Wir haben die gleichen Fraktionen bearbeitet und durch hochstufige Craig-Verteilung und Verwendung eines neuen papierchromatographischen Verfahrens¹ 1. ein *Monophosphoinositid* im Rinderhirn auffinden, 2. die Zusammensetzung der *Sojaphosphoinositide* nach Auftrennung in die einzelnen Komponenten klären, und 3. ein *Lysomonophosphoinositid* sowohl im Gehirn als auch im „Sojalecithin“ nachweisen können.

Inositphosphatide des Rinderhirns

Die nach FOLCH [4] gewonnene erste „Folch-Fraktion“ (Aufarbeitung von frischem Rinderhirn nach DEBUCH [1] und Reinigung nach SMITH [17] über Cellulosesäulen) kann durch eine 90stufige Craig-Verteilung im System Methanol(97%ig)/Petroläther/Benzin (3:1:3) in *zwei* inosithaltige Fraktionen zerlegt werden. Fraktion I (Verteilungselemente 1—40) enthält außer der Inositkomponente noch Phosphatidylserin (PS). Fraktion II (Verteilungselemente 75—80) ist einheitlich, ihre Substanz im Phosphor- und Inositgehalt, IR-spektroskopisch und papierchromatographisch mit dem bereits von FOLCH [6] isolierten DPI identisch².

Um aus Fraktion I das Inositphosphatid zu erhalten, verteilt man zunächst über 200 Stufen im System Methanol/Wasser/Äther/Benzin (5:1:5:5,5),

¹ Einzelheiten der neuen Methode, welche die Auftrennung und Analyse auch von Rohphosphatidgemischen gestattet, werden demnächst veröffentlicht.

² Wir danken Herrn Prof. Dr. J. FOLCH, New York, für die Überlassung einer Probe DPI.

Tabelle

	Hirn		Lyso-		Soja		Herz- muskel MPI	Leber MPI	Weizen- keime MPI
	Fraktion I MPI + PS	Fraktion II DPI	MPI	PS	Fraktion I MPI	Fraktion II Lipositol			
R _F -Werte ¹ in Bu/Ei/Wa (4:1:5)	0,49	0,59	0,33—0,36	0,30	0,39	0,44	0,25—0,28	0,45	0,45
Phosphor Prozent	3,6	9,5	—	—	—	2,9	anorg. + org. 2,85 anorg. 0,53	3,30	3,55
Inosit Prozent bzw. Inosit/Phosphor	6,5 ⁰ / ₀	—	—	—	—	18,5 ⁰ / ₀	8,8—12,8 ⁰ / ₀	1,00	0,96
Jodzahl	55	51	—	—	—	102—106	51	—	56—67

¹ Chromatogrammpapier: Schl. & Sch. 2043b nach besonderem Verfahren mit Formaldehyd imprägniert. Fließmittel: Butanol/Eis-
essig/Wasser (4:1:5), aufsteigend. Reagentien: Rhodamin, Nilblau, Osmiumtetroxyd und Malachitgrün.

wobei IR-spektroskopisch reines PS¹ anfällt, und anschließend über weitere 300 Stufen im System Tetrachlorkohlenstoff/Methylenchlorid / Methanol / Äthanol / Wasser (100:7,5:50:10:6).

Nach Inosit- und Phosphorgehalt, sowie auf Grund der papierchromatographischen Übereinstimmung mit MPI aus Herzmuskel und Leber² handelte es sich bei dieser Substanz um ein *Monophosphoinositid*. An Fettsäuren waren Stearinsäure, Ölsäure und eine zweite ungesättigte noch nicht identifizierte Säure nachweisbar. Das gleichzeitige Vorkommen eines MPI und DPI in tierischen oder pflanzlichen Geweben wurde bisher noch nicht beschrieben.

Unterwirft man Fraktion I einigen Reinigungsprozessen, so entstehen zwei weitere Substanzen, die sich papierchromatographisch als Lyso-Verbindungen des MPI und PS zu erkennen geben. Da dieselben Verbindungen nach Behandlung mit Eisessig und Bienengiftphospholipase nicht in Erscheinung treten, ist anzunehmen, daß die Lysoverbindungen des MPI und PS ausschließlich auf oxydativem Wege gebildet werden. Über die Existenz einer Lysoverbindung des MPI war bisher noch nichts bekannt.

¹ PS wurde bisher nur einmal in angereicherter Form von FOLCH [5] aus Rinderhirn erhalten.

² Von uns nach Vorschriften von MORELEC-COULON [3] bzw. MCKIBBIN [1,13] dargestellt.

Inositphosphatide der Sojabohne

Die alkoholunlösliche Inosit-Fraktion von käuflichem „Sojalecithin“¹ kann erst durch 50stufige, besser noch 80 stufige Craig-Verteilung im System Äthanol (85°/oig)/Petroläther (1:1) in *zwei* voneinander verschiedene Inositide aufgetrennt werden (Fraktion I = Verteilungselemente 0–5, Fraktion II = 50–80). Eine Verteilung über 25 Stufen, wie sie schon früher von SCHOLFIELD u. DUTTON [16] durchgeführt wurde, war nicht ausreichend, um eine Trennung herbeizuführen.

Die Substanz der Fraktion I ergibt ein Inosit:Phosphor-Verhältnis von 1:1, liefert die Fettsäuren Linol- und Palmitinsäure, zeigt im Chromatogramm mit MPI aus Herzmuskel, Leber und Rinderhirn Übereinstimmung und muß daher mit dem von OKUHARA u. NAKAYAMA [15] isolierten MPI identisch sein. In den meisten Fällen ist auch dieses MPI, namentlich wenn man von käuflichem „Sojalecithin“ ausgeht, von seiner *Lyso*-Form begleitet.

Die Substanz der Fraktion II hat eine andere Laufhöhe als DPI aus Rinderhirn und ergibt außerdem bei der Hydrolyse neben *Inosit*, *Äthanolamin* und *Fettsäuren* (Linolsäure, Ölsäure und Stearinsäure) noch *Arabinose* und *Galactose*. In der Literatur wird diese Substanz häufig als Lipositol bezeichnet. Das Inosit : Phosphor-Verhältnis beträgt wie bei dem MPI aus Soja 1:1, so daß auch hier ein MPI-Derivat vorliegt, was gut mit den Angaben anderer Autoren übereinstimmt, die bei der Hydrolyse der gesamten Sojainositfraktion immer nur MPI oder Inositmonophosphorsäure [11] isolieren konnten. Im IR-Spektrum tritt die für Glycerinphosphatide typische Esterbande bei $5,8 \mu$ nicht in Erscheinung. Obwohl nicht eindeutig feststeht, ob diese Substanz als Di- oder Trisaccharid vorliegt, ist damit Wesentliches geklärt.

Die alkoholunlösliche Inositfraktion des „Sojalecithins“ bzw. der Sojabohne hat folgende Zusammensetzung:

1. Ein MPI, das mit den Monophosphoinositiden des Herzmuskels, der Leber und des Rinderhirns mit Ausnahme des Fettsäureanteils übereinstimmt.
2. Ein Lyso-MPI, das sehr wahrscheinlich aus MPI auf oxydativem Wege entsteht und besonders stark im „Sojalecithin“ enthalten ist.
3. Eine Verbindung von Monoinositphosphat, die zusätzlich noch Fettsäuren, Äthanolamin, Arabinose und Galaktose enthält.

Literatur

- [1] DEBUCH, H.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **304**, 109 (1956). — [2] FAURE, M., et J. MORELEC-COULON: C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **236**, 1104 (1953). — [3] FAURE, M., et M. J. MORELEC-COULON: C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **238**,

¹ Wir danken der Fa. Nattermann, Köln, für das uns zur Verfügung gestellte Präparat.

411 (1954). — [4] FOLCH, J.: J. biol. Chem. **146**, 35 (1942). — [5] FOLCH, J.: J. biol. Chem. **174**, 439 (1948). — [6] FOLCH, J.: J. biol. Chem. **177**, 497, 505 (1949). — [7] FOLCH, J., and F. N. LEBARON: Canad. J. Biochem. **34**, 305 (1956). — [8] HAWTHORNE, J. N.: Biochim. biophys. Acta **18**, 389 (1955). — [9] HAWTHORNE, J. N., and E. CHARGAFF: J. biol. Chem. **206**, 27 (1954). — [10] HAWTHORNE, J. N., and J. HAWTHORNE: Intern. Conf. Biochem. Probl. Lipids, Ghent, Belgium, p. 104 (Butterworths Scientific Publications, London 1956). — [11] KLENK, E., u. R. SAKAI: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **258**, 33 (1939). — [12] MALKIN, T., and A. G. POOLE: J. chem. Soc. 3470 (1953). — [13] McKIBBIN, J. M.: J. biol. Chem. **220**, 537 (1956). — [14] NOMURA, D.: J. Jap. Chem. **3**, 145 (1949). — [15] OKUHARA, F., and T. NAKAYAMA: J. biol. Chem. **215**, 295 (1955). — [16] SCHOLFIELD, C. R., and H. J. DUTTON: J. biol. Chem. **208**, 461 (1954). — [17] SMITH, R. H.: Biochem. J. **57**, 130 (1954). — [18] VILKAS, E., et E. LEDERER: Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **38**, 111 (1956).

Prof. Dr. L. HÖRHAMMER, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre
der Universität, München 2, Karlstr. 29

Über die Inositphosphatide des Rinderhirns

Von

LUDWIG HÖRHAMMER, HILDEBERT WAGNER und JOSEF HÖLZL

Aus dem Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. September 1959)

Wie wir in einer vorläufigen Mitteilung [11] berichteten, enthalten Rinderhirn-Phosphatidextrakte außer dem von FOLCH [7] aufgefundenen *Diphosphoinositid* ein zweites *inosithaltiges* Phosphatid, das mit *Monophosphoinositid* identisch ist. Obwohl die Inositfraktion des Rinderhirns schon mehrmals analytisch und biochemisch bearbeitet wurde (FOLCH [6, 7]; HAWTHORNE [9, 10]), war das MPI¹ wohl auf Grund seiner geringen Menge, in der es im Rinderhirn enthalten ist, immer wieder dem Nachweis entgangen. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Isolierung und Identifizierung von MPI, welche sich im wesentlichen auf ein neues papierchromatographisches Verfahren stützt, wurde durch analytische Untersuchungen am DPI¹ ergänzt, worüber wir gleichfalls berichten.

Ergebnisse

Bei der Auftrennung der „Kephalinfraktion“ nach FOLCH [7] gelangt der größte Teil von MPI zusammen mit PS¹, PÄ¹ und DPI in die erste Folch-Fraktion, ist aber in abnehmender Konzentration noch bis in die 4. Fraktion nachweisbar. Die Abtrennung von DPI gelingt durch eine Verteilung zwischen Petroläther(3)-Methanol(2) über 90 Stufen, wobei man das DPI vorwiegend in den Elementen 60—90 findet. PS verteilt sich ohne erkennbares Maximum auf die Elemente 1—75, während MPI in angereicherter Form in den Elementen 1—30 zusammen mit PS erscheint.

Da MPI in der Kephalinfraktion nur zu etwa 10%₀ enthalten ist, war eine Reindarstellung durch eine einzige Verteilung von vornherein nicht zu erwarten. In einer zweiten Verteilung, diesmal im System Methanol-Wasser-Äther-Benzin (5:1:5:5,5) über eine Stufenzahl von 160 wurde daher versucht, das MPI noch weiter anzureichern. Obwohl PS auch jetzt wieder in fast allen Elementen auftrat, hatte das MPI eine Konzentrierung auf etwa 30%₀ erfahren.

¹ MPI = Monophosphoinositid; DPI = Diphosphoinositid; PS = Phosphatidylserin; PÄ = Phosphatidyläthanolamin.

Die Papierchromatographie auf mit Formaldehyd behandelten Papieren in 4 verschiedenen Systemen (siehe Tab.1) ergab für MPI gleiche Laufhöhe mit MPI-Präparaten, die wir aus Herzmuskel, Rinderleber und „Sojalecithin“ gewonnen hatten (siehe Abb.1).

Die prozentuale Verteilung von Phosphor, Stickstoff und Inosit über die einzelnen Fraktionen des Isolierungsganges ist aus Tab.2 ersichtlich.

Tabelle 1

System	MPI	PS
Bu-Ei-Wa (4:1:5)	0,48	0,51
Isobutylketon-Ei-Wa (40:30:7)	0,50	0,60
Bu. wassergesättigt	0,85*	1,00
Äthylaz.-Ameis.-Wa (10:2:3)	0,95	0,98

* R_{ps} = durchlaufene Strecke im Verhältnis zur durchlaufenen Strecke von PS.

McKIBBIN [14] dargestellt haben. Die Substanz besitzt im System Methanol-Isopropanol-Ammoniak-5%₀ (30:5:15) einen R_F -Wert von 0,24 und ist sowohl mit Silbernitrat als auch mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure anfärbbar.

Tabelle 2

Fraktion	Inosit frei %	Inosit gebund. %	P %	N %
„Kephalin“	2,3	1,8	3,60	1,37
FOLCH I	4,6	3,6	4,45	1,78
FOLCH I n. Cellulose	—	3,8	4,21	1,24
MPI u. PS d. 2. Vert.	—	7,2	3,46	0,95

An *Fettsäuren* enthält das MPI-Gemisch *Stearinsäure*, *Ölsäure* und eine zweite ungesättigte Fettsäure der C_{20} -Reihe. Da die gleichen Fettsäuren auch in reinem PS vorkommen, ist nicht zu entscheiden, ob die Fettsäurezusammensetzung von MPI mit der des PS völlig übereinstimmt. Der Einwand, das MPI könnte im Laufe der Aufarbeitung aus dem DPI entstanden sein, ließ sich dadurch entkräften, daß MPI bereits 8 Std nach dem Töten der Tiere bei schonendster Aufarbeitung auf dem Chromatogramm nachgewiesen werden konnte.

Diphosphoinositid

DPI aus der 1. Verteilung gibt, nach der absteigenden Methode chromatographiert, 3 Flecke, die mit Nilblau, fuchsin-schweiflicher Säure und Ammoniummolybdat-Perchlorsäure anfärbbar sind (Abb.2). Daß in der substanzmäßigen Zusammensetzung Übereinstimmung mit dem von

FOLCH isolierten DPI besteht, konnte durch die Aufnahme der IR-Spektren und den papierchromatographischen Vergleich mit einer von FOLCH zur Verfügung gestellten Substanzprobe gesichert werden.

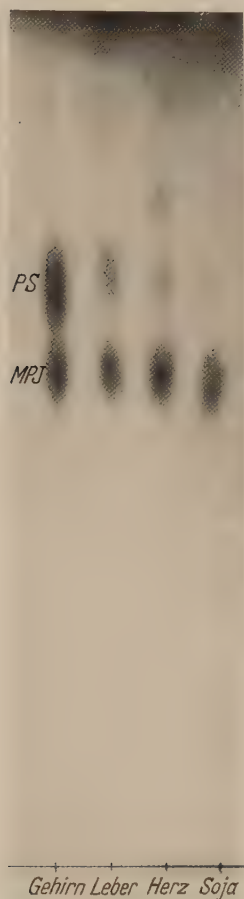


Abb. 1

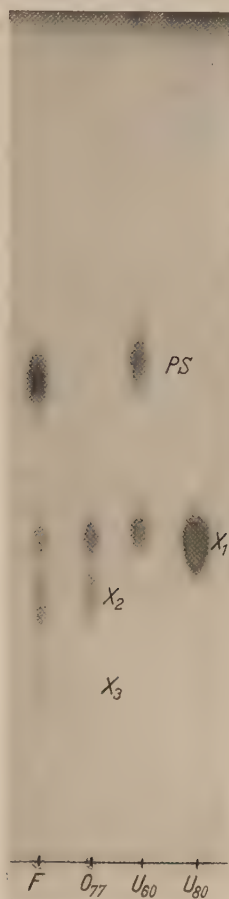


Abb. 2

Abb. 1. MPI u. PS aus Rinderhirn mit Vergleichssubstanzen aus Leber, Herzmuskel und Sojabohne.
System: Bu-Ei-Wa (4:1:5) absteigend. Anfärbereagens: Nilblaulösung

Abb. 2. DPI auf Formaldehydpapier. System: Bu-Ei-Wa (4:1:5) absteigend. Anfärbereagens: Nilblaulösung. *F* DPI nach FOLCH [7], *O₇₇* DPI aus der Oberphase des Elements 77 d. 1. Verteilung. *U₆₀* *X₁* DPI aus Element 60 d. Unterphase mit PS. *U₈₀* reines *X₁* DPI aus Element 80 der Unterphase

Der *Fettsäureanteil* des DPI-Gemisches besteht aus *Stearin-*, *Öl-*, *Linol-* und *Linolensäure* und einer geringen Menge von drei weiteren ungesättigten Fettsäuren. Da sich bei FOLCH keine Angabe darüber findet, ob DPI Inhaltsstoff aller Teile des Gehirns ist, wurde die *graue* und *weiße* Substanz des Rinderhirns getrennt präpariert, nach FOLCH

aufgearbeitet und untersucht. Hiernach ist DPI nur in der weißen Substanz enthalten, während MPI sowohl in der weißen Substanz als auch in der grauen Substanz nachweisbar ist. Bei der papierchromatographischen Untersuchung zweier Gehirnphosphatidpräparate (*Cerebrale* und *Diencephale*¹) wurden einwandfrei beide Verbindungen gefunden.

Lysoverbindungen

Lysoverbindungen geben sich auf dem Chromatogramm nach Rhodamin- oder Malachitgrün-Behandlung als weiße Flecken zu erkennen. Wir beobachteten diese bei der Aufarbeitung des Extraktes, namentlich wenn die Fraktionen in wäßrigen Lösungen längere Zeit der Luft und dem Licht ausgesetzt waren. Sie traten auch auf nach 12stündiger Behandlung mit einer 0,2n Lauge bei 37°C oder nach Einwirkung von *Bienengift-Phospholipase*, wenn in einer Äther-Wasser-Emulsion inkubiert wurde. Wie sich bei einer genaueren Untersuchung herausstellte, handelte es sich in der Hauptsache um Lysoverbindungen von MPI und PS. Behandelt man das Gemisch aber mit 90%iger Essigsäure, so entsteht eine Lysoverbindung nur aus dem PS, während das MPI dabei intakt bleibt, eine Erscheinung, die nicht der Erwartung entsprach, da beide Phosphatide eine positive Plasmalreaktion gaben. Auch DPI läßt sich mit fuchsinschweflicher Säure anfärben, spaltet aber weder durch Alkali- noch durch Säureeinwirkung oder Enzymbehandlung eine entsprechende Lysoverbindung ab, so daß der Reaktion auf Plasmale wenig Spezifität zukommen kann.

Diskussion

Durch den Nachweis von MPI im Rinderhirn haben sich die Vermutungen von HOKIN [13] bestätigt. Der von HOKIN [13] auf dem Autoradiogramm beobachtete unbekannte Substanzfleck nach Inkubation von Rinderhirngewebe mit markiertem Phosphat ist nunmehr eindeutig dem MPI zuzuordnen.

Die Tatsache, daß bei der Verteilung eine inosithaltige lipoidlösliche Substanz abgetrennt wurde, die sich papierchromatographisch in 3 Substanzen aufteilte, wirft die Frage auf, ob DPI ein Phosphatid ist, das in drei verschiedenen Formen auftritt, oder ob im Gehirn noch Phosphatide vorkommen, die bisher noch nicht beschrieben wurden. Wenn eine dieser 3 Substanzen oder alle drei tatsächlich als DPI vorliegen, dann hätte man den bemerkenswerten Fall, daß ein Organ zwei verschiedene Inositphosphatide, nämlich ein Monophosphoinositid und Diphosphoinositid enthält.

Damit ergibt sich gleichzeitig eine neue Diskussionsgrundlage für die Arbeiten von SLOANE-STANLY [17] und RODNIGHT [16]. Während

¹ „Cerebrale“ und „Diencephale“ wurden uns dankenswerterweise von der Firma Etapharm, Wien, zur Verfügung gestellt.

SLOANE-STANLY nach der Inkubation einer Gehirn-Kephalinfraktion (mit etwa 40% DPI-Gehalt) mit Gehirnsuspension nur feststellen konnte, daß die abgespaltene Inositphosphatmenge wesentlich höher war als bei anderen Lipoidpräparaten, wurde diese Frage von RODNIGHT insofern näher beantwortet, als sich bei seinen Versuchen auch mit reinem DPI-Natrium eine 6mal höhere Hydrolysegeschwindigkeit ergab, als sie bei anderen Inositphosphatidpräparaten festgestellt wurde. Nachdem DAWSON [3] im Pankreas ein für Phosphatidspaltung spezifisches Enzym gefunden hatte, das auch MPI anzugreifen imstande war, ist nunmehr auf Grund der neuen Befunde völlig offen, ob bei allen bisher untersuchten Inositpräparaten auch MPI an der Reaktion beteiligt ist. Eventuell sind zwei verschiedene Enzymsysteme für den Abbau von MPI bzw. DPI verantwortlich, wodurch sich der exakte Nachweis weiter komplizieren würde.

Andererseits ist zu prüfen, ob sich der von DAWSON [4] beschriebene ³²P-Einbau in die Inositphosphatide des Gehirns auf DPI allein erstreckt oder in der gleichen Intensität auch beim MPI zu beachten ist. Ähnliches wäre für den Inositanteil zu fordern, der nach Untersuchungen von AGRANOFF u. Mitarb. [1] ohne vorausgegangene Phosphorylierung im Gegensatz zu Cholin, Äthanolamin und Serin in Phosphatidsäuren eingebaut wird.

Von der Klärung dieser Punkte wird man nicht nur eine Aussage über die Beziehungen zwischen MPI und DPI erwarten dürfen, sondern auch erfahren, ob die biochemische Sonderstellung der Inositphosphatide zu Recht besteht.

Experimenteller Teil

a) Herstellung einer Folch-Fraktion. Aus 5 kg frischem Rinderhirn extrahierten wir die Phosphatide nach einer Methode von DEBUCH [5]. Nach zweimaligem Umfällen der Ätherlösung mit Aceton und Methanol resultierten 115 g einer weißen, pulverisierbaren Substanz, die das Rohkephalin darstellte. Die weitere Auftrennung erfolgte durch die Chloroform-Methanol-Methode nach FOLCH [7]. Die erste Fraktion (28 g weißgelbliche Substanz) war Ausgangsprodukt für die weiteren Untersuchungen. Um wasserlösliche Verunreinigungen (Phosphate, Inosit, Aminosäuren) zu entfernen, lösten wir 5 g Phosphatide nach SMITH [18] in 50 ml der Unterphase des Gemisches Chloroform-Äthanol-Wasser (80:20:2,5) und brachten diese Lösung auf eine Cellulosesäule von 25 cm Länge und 4 cm Durchmesser. Eluiermittel: 150 ml Chloroform. Das Eluat wurde von Chloroform befreit, der Rückstand erneut in 8 Teilen Chloroform aufgenommen und 12 Teile Methanol zugegeben, um das zu etwa 5% in dieser Fraktion noch vorliegende Phosphatidyläthanolamin auszufällen. Diese Fällungen wiederholten wir noch einmal. Die verbliebenen 18 g Phosphatidgemisch, die PS, MPI und DPI enthielten, gelangten zur Auftrennung in die Craig-Apparatur.

b) Verteilung 1. Die Verteilung erfolgt über 90 Stufen im System Petroläther (Sdp. 90–100°C)-Methanol (96%) (3:2) in einer vollautomatischen Verteilungsmaschine nach v. METZSCH (Unterphasenkapazität 50 ml). Eingesetzte Substanzmenge bei 4 Verteilungen war jeweils 4,5 g Phosphatidgemisch. Bei jeder Verteilung

wurden die Phasen durch 40maliges Umschütteln innerhalb von 3 min äquilibriert. Die Identifizierung der Substanzen in den einzelnen Elementen erfolgte papierchromatographisch in den bis fast zur Trockene eingedampften Lösungen. Die Verteilung der Substanzen geht aus folgender Tabelle hervor:

Elemente	PS	MPI	DPI	PÄ	Gangliosid
	1—70	1—30	60—90	1—7	1

Die beiden Lipoide PÄ und Gangliosid, die in der Ausgangssubstanz papierchromatographisch nicht nachweisbar waren, traten erst durch die Anreicherung bei der Verteilung in Erscheinung.

c) Verteilung 2. Das Phosphatidgemisch der Elemente 8—30 aus den 4 Verteilungen, etwa 5 g, die nur noch PS und MPI enthielten, wurde ein zweites Mal, diesmal im System Methanol-Wasser-Äther-Benzin (5:1:5:5,5¹) über 160 Elemente verteilt. Die aus den Elementen 2—15 entnommene Substanzmenge enthielt PS und MPI, das bis zu etwa 30% angereichert vorlag. Da eine weitere Anreicherung mit Hilfe der Craig-Verteilung in Anbetracht der geringen Substanzmenge wenig aussichtsreich war, erfolgte die Identifizierung über die Hydrolyseprodukte.

d) Identifizierung von MPI. Der Abbau des MPI-Gemisches erfolgte nach McKIBBIN [14] durch Hydrolyse mit 6n Salzsäure. Dazu wurden 0,1 g des Gemisches in 1 ml Chloroform gelöst, mit 5 ml 6n Salzsäure emulgiert und das Chloroform anschließend im Vakuum wieder abgezogen. Das Emulgieren hat den Zweck, das Phosphatid mit der Salzsäure in innige Berührung zu bringen, was sich bei einer kurzfristigen Hydrolyse als unerlässlich erwiesen hat. Nach dem Abkühlen der Hydrolyselösung schüttelten wir die lipoidlöslichen Anteile mit 10 ml Petroläther aus, trennten aus dieser Petrolätherlösung die unveränderten Phosphatide sowie Lysoformen und Phosphatidsäuren durch Zugabe von 15 ml 97%igem Methanol ab und chromatographierten den wasserlöslichen Anteil im System Isopropanol-Ammoniak(5%)—Methanol (5:15:30) nach der aufsteigenden Methode auf Schleicher u. Schüll-Papier 2043 b. Anfärbereagens: Ammoniummolybdat-Perchlorsäure nach HANES u. ISHERWOOD [8]. R_F von Inositmonophosphat, dargestellt nach McKIBBIN aus Leber = 0,24; R_F von Inositmonophosphat aus PS-MPI-Gemisch = 0,24; R_F von Serinphosphat = 0,26.

Der Nachweis von Inosit erfolgte nach Chromatographie in Butanol-Eisessig-Wasser mit ammoniakalischer Silbernitratlösung (R_F = 0,11), von Serin nach Chromatographie im gleichen System mit Ninhydrinlösung (R_F = 0,18).

e) Chromatographie der Fettsäuren von MPI, PS und DPI. Zum Nachweis der Fettsäuren wurde das MPI-PS-Gemisch (100 mg) und die DPI-Präparate 6 Std mit 6n Salzsäure am Rückfluß erhitzt, die Fettsäuren mehrmals mit 5 ml Äther ausgeschüttelt und die konzentrierten Lösungen auf paraffiniertem Papier nach POKORNY [15] in Eisessig chromatographiert. Anfärbereagentien: Kupferacetat-Kaliumferrocyanid für die gesättigten Fettsäuren und Osmiumtetroxyd für die ungesättigten Fettsäuren. Für das MPI-PS-Gemisch wurden folgende Fettsäuren gefunden:

Stearinsäure	R_F = 0,40	Linolsäure	R_F = 0,58
Ölsäure	R_F = 0,50	Linolensäure	R_F = 0,64,

außerdem eine nicht näher definierte ungesättigte Fettsäure, vermutlich eine Eikosensäure, die Bestandteil des MPI ist. Im DPI ließen sich außer diesen 3 ungesättigten Fettsäuren mit den R_F -Werten 0,40, 0,36, 0,22 nachweisen.

¹ In früheren Versuchen wurde noch das System Tetrachlorkohlenstoff-Methylenchlorid-Methanol-Äthanol-Wasser (100:7,5:50:10:6) verwendet.

f) **Darstellung der Lysoformen.** α) 0,1 g Phosphatid wurde nach DEBUCH [5] in 0,5 ml *Eisessig* gelöst und die Lösung 15 Std bei 37°C stehen gelassen. Chromatographie nach dem Entfernen des Eisessigs auf Formaldehydpapier aufsteigend.

β) Zur Enzymspaltung wurden 10 ml einer 1%igen Phosphatidlösung in Äther mit 1 ml einer 0,1%igen, wäßrigen *Bienengiftlösung* versetzt, durch mehrmaliges Umschütteln emulgiert und 12 Std bei 37°C inkubiert. Chromatographie der wäßrigen und ätherischen Lösung in der vorher beschriebenen Weise.

γ) 0,1 g Phosphatid wurde nach McKIBBIN [14] mit 4 ml einer 0,2 n KOH emulgiert und 12 Std bei 20°C stehen gelassen.

Der papierchromatographische Nachweis der Lysoverbindungen erfolgte mit einer 1%igen Malachitgrünlösung nach HÖRHAMMER u. Mitarb. [12].

R_F von Lyso-MPI = 0,33, R_F von Lyso-PS = 0,42.

g) **Analytische Bestimmungen.** 1. Die Phosphorbestimmung erfolgte nach einer Laboratoriumsvorschrift der Firma Boehringer, Tutzing.

2. Die Stickstoffbestimmung wurde nach einer modifizierten Mikro-Kjeldahl-Methode der Firma Boehringer, Tutzing, durchgeführt. n/10 Borsäure für Puffergemische nach Sörensen (Merck Nr. 166) zur Beschickung der Vorlage mit einem Mischindicator bestehend aus 2 Teilen einer 0,1%igen alkoholischen Methylrotlösung (Methylrot Merck Nr. 6076) und 1 Teil einer 0,1%igen alkoholischen Methylenblaulösung (Methylenblau plv. sbt. Merck Nr. 6044).

3. Die Inositbestimmung erfolgte nach BÖHM u. RICHARZ [2] durch Oxydation des Inosits mit Perjodsäure nach der papierchromatographischen Isolierung aus dem Hydrolysat.

h) **Herkunft der Vergleichssubstanzen** siehe HÖRHAMMER u. Mitarb. [12].

Zusammenfassung

Monophosphoinositid, das bisher im tierischen Organismus nur im Herzmuskel und in der Leber nachgewiesen wurde, ist ein Bestandteil der Gehirnphosphatide. Die Identifizierung erfolgte papierchromatographisch auf Formaldehydpapier, durch den Nachweis von Inositmonophosphat nach einer partiellen Hydrolyse, durch Herstellung der Lysoverbindung und mit Hilfe der analytischen Werte.

Diphosphoinositid wurde durch multiplikative Verteilung von den übrigen Phosphatiden abgetrennt. Auf dem Papierchromatogramm konnte die Substanz in drei verschiedene Fraktionen aufgetrennt werden.

Bei der papierchromatographischen Untersuchung der grauen und weißen Substanz des Gehirns wurde *Monophosphoinositid* in der weißen und grauen Substanz gefunden, während *Diphosphoinositid* nur in der weißen enthalten ist.

Lysoverbindungen konnten nur von Phosphatidylserin und Monophosphoinositid hergestellt und nachgewiesen werden, nicht aber von Diphosphoinositid.

Summary

In the animal organism *monophosphoinositide* so far has been known as a component of heart and liver only. Now it has been demonstrated as a constituent of brain phosphatides. Identification was performed by paper chromatography on formaldehyde paper, by the demonstration of

inosite monophosphate after partial hydrolysis, by formation of the lyso compound, and by analytical data.

Diphospho inositide was separated from other phosphatides by multiplicative distribution. The substance was separated into three different fractions by paper chromatography. By paper chromatographical examination of the gray and white matters of the brain *monophospho inositide* was found in *both fractions*, whereas *diphospho inositide* occurs only in the *white matter*.

Lyso compounds could be prepared and demonstrated only from phosphatidyl serine and monophospho inositide, not from diphospho inositide.

Literatur

- [1] AGRANOFF, B. M., R. M. BRADLEY and R. O. BRADY: J. biol. Chem. **230**, 11071 (1958). — [2] BÖHM, P., u. G. RICHAZ: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **298**, 110 (1954). — [3] DAWSON, R. M. C.: Persönl. Mitteilung; zit.: KEMP, P., G. HÜBSCHER u. J. N. HAWTHORNE: Biochim. biophys. Acta **31**, 585 (1959). — [4] DAWSON, R. M. C.: Biochem. J. **61**, 552 (1955). — [5] DEBUCH, H.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **304**, 109 (1956). — [6] FOLCH, J.: J. biol. Chem. **146**, 35 (1942). — [7] FOLCH, J.: J. biol. Chem. **177**, 497 (1949). — [8] HANES, C. S., and F. A. ISHERWOOD: Nature (Lond.) **164**, 1107 (1949). — [9] HAWTHORNE, J. N., and G. HÜBSCHER: Biochem. J. **67**, 523 (1957). — [10] HAWTHORNE, J. N.: Biochim. biophys. Acta **18**, 389 (1955). — [11] HÖRHAMMER, L., H. WAGNER u. J. HÖLZL: Biochem. Z. **330**, 591 (1958). — [12] HÖRHAMMER, L., H. WAGNER u. G. RICHTER: Biochem. Z. **331**, 155 (1959). — [13] HOKIN, L. E., and M. R. HOKIN: J. biol. Chem. **233**, 818 (1958). — [14] MCKIBBIN, J. M.: J. biol. Chem. **220**, 537 (1956). — [15] POKORNY, J.: Naturwissenschaften **43**, 375 (1956). — [16] RODNIGHT, R.: Biochem. J. **63**, 223 (1956). — [17] SLOANE-STANLY, G. H.: Biochem. J. **53**, 613 (1953). — [18] SMITH, R. H.: Biochem. J. **57**, 130 (1954).

Professor Dr. L. HÖRHAMMER, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität, München 2, Karlstraße 29

Lebenslauf

Am 22. November 1929 wurde ich als Sohn des Landwirts Josef Hölzl und seiner Ehefrau Juliana, geb. Zeiler, geboren.

Von 1936 bis 1943 besuchte ich die Volksschule in Tüntenhausen und ab 1943 die Aufbauschule in Freising. Dort legte ich im Juli 1950 die Reifeprüfung ab.

Im Oktober 1951 begann ich in der Albrecht-Apotheke in München meine Praktikantenzeit. Nach bestandenem Vorexamen im September 1953, begann ich im Wintersemester 1953/54 an der Universität München das Pharmazie-Studium, das ich im November 1956 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen beendete.

Von Dezember 1956 bis Mai 1957 war ich in der Antonius-Apotheke in München tätig und erhielt am 1. Dezember 1957 die Bestallung als Apotheker.

Die vorliegende Arbeit begann ich im Mai 1957 unter Leitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer. Sie wurde im Frühjahr 1959 abgeschlossen.

